

ВПЛИВ ЛПОСОМАЛЬНОГО ДОКСОРУБЦИНУ ТА ІНДУКТИВНОЇ ПОМІРНОЇ ГІПЕРТЕРМІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ПРОАПОПТОЗНОГО БІЛКА Bax У КЛІТИНАХ ОСТЕОГЕННОЇ САРКОМИ Saos-2

Орел В.Е.,^{1,2} Просвітова А.Б.,² Дєдков А.Г.,¹ Лихова О.О.,³ Колесник Д.Л.,³ Орел В.Б.,^{1,2}
Дасюкевич О.Й.,¹ Рихальський О.Ю.¹

¹ДНП «Національний інститут раку», м. Київ, Україна

² Факультет біомедичної інженерії НТУУ «КПІ імені Ігоря Сікорського», м. Київ, Україна

³Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, м. Київ, Україна

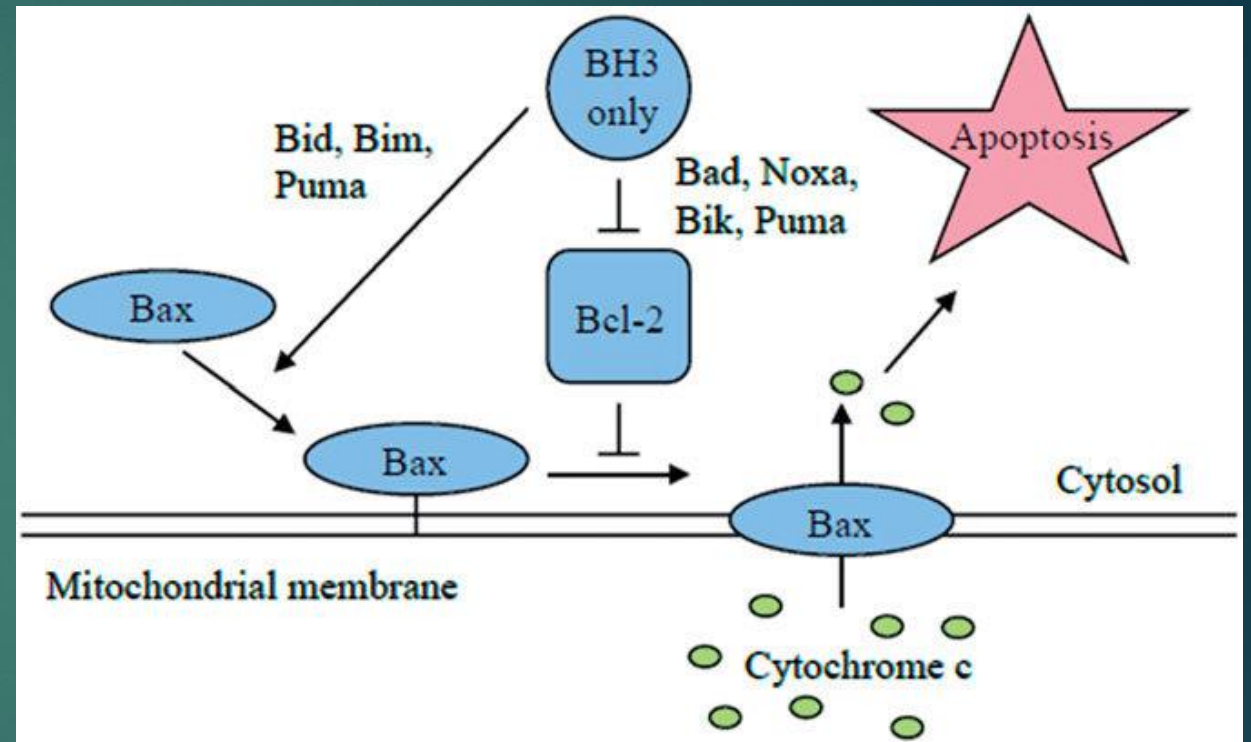
*VI науково-практична конференція з міжнародною участю
«МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ І ХВОРОБ ТА ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ»
Харків - 2023*

Вступ

- ▶ **Ліпосомальний доксорубіцин** є формою протипухлинного лікарського засобу доксорубіцину, який міститься у ліпосомах. Зменшена токсичність до нормальних тканин, покращена фармакокінетика та збільшена ефективність є суттєвими перевагами ліпосомального доксорубіцину [Allen T. M. et al., 2012].
- ▶ Комбіноване використання ліпосомального доксорубіцину (ЛДР) з **гіпертермією** ініціює збільшення безпосереднього ефекту протипухлинної дії хіміотерапевтичного препарату на саркоми та зменшення побічних ефектів у нормальних тканинах [Ruiz A. et al., 2020].
- ▶ **Гетерогенність експресії білка Вах** з родини білків Vcl-2 відображає чутливість до апоптозу клітин [Valdés F. et al., 2017].

Роль ВАХ у апоптозі

- ▶ Вах (член родини Bcl-2) – білок, який задіяний у регуляції апоптозу. Його основний функціонал у цьому процесі – ініціація апоптозу (після активації різними сигналами він ініціює каскад подій, які розпочинають апоптоз), порушення мітохондріальної мембрани (вбудовується у зовнішню мембрану та порушує її цілісність) та активує каспази.
- ▶ Проапоптозний білок Вах відіграє суттєву роль у молекулярних механізмах, які лежать в основі сенсibilізації клітин остеосаркоми Saos-2 до протипухлинної дії препаратів і у регуляції їхньої резистентності до хіміотерапії.



Механізм вбудовування ВАХ у мітохондріальну мембрану та подальша активація каспази, яка призводить до апоптозу клітини
[Rabih Roufael et.al., 2017]

Мета

- ▶ Дослідити ефект комбінованого впливу ліпосомального доксорубіцину та індуктивної помірної гіпертермії на експресію проапоптозного білка Вах у клітинах остеосаркоми Saos-2.

Матеріали та методи

▶ Клітини

Клітини остеосаркоми Saos-2 (ATCC HTB-85) були отримані з Банку клітинних ліній тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Кавецького НАН України. Клітини Saos-2 культивували в поживному середовищі DMEM/F12 з 10% фетальної сироватки теляти і Antibiotic-Antimycotic. Клітини культивували у зволоженій атмосфері при 5% CO₂ і 37°C. [R. Ian Freshney; 2021]

▶ Експеримент

На клітини діяли електромагнітним опроміненням (ЕО) 42 МГц потужністю 10 Вт протягом 30 хв апаратом «Магнітерм» (Радмір, Україна) з магнітно-дипольним аплікатором (НІР, Україна). Клітини обробляли 0,4 мкг/мл ЛДР з подальшим негайним впливом ЕО протягом 30 хвилин.

Групи: 1 (контроль) - клітини Saos-2 без обробки; 2 – вплив електромагнітного поля (ЕО), 3- ЛДР, 4 – вплив ЛДР + ЕО.

▶ Імуноцитохімічний аналіз

Клітини Saos-2 обробляли препаратом та інкубували 72 години за стандартних умов, після чого фіксували розчином метанол (Sigma-Aldrich, США) + ацетон (Хімрезерв, Україна). Первинні моноклональні антитіла проти Вах (clone 6A7, Thermo Scientific, США) наносили на клітини та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Для візуалізації імуноцитохімічної реакції використовували SuperPicture Polymer Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Клітини дофарбовували гематоксиліном протягом 2 хвилин. Експресію білків оцінювали напівкількісно методом H-Score.

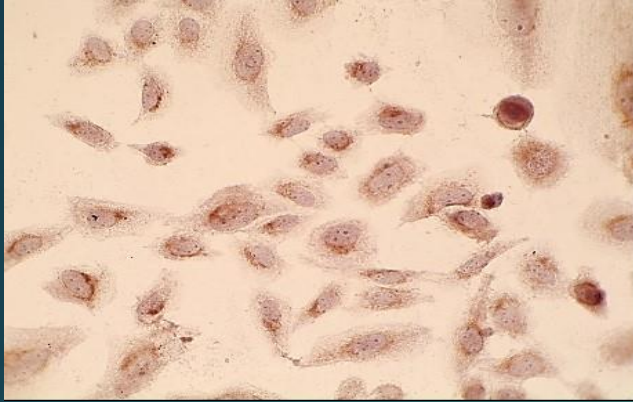
▶ Комп'ютерний аналіз гетерогенності експресії Вах

Оцінка гетерогенності експресії Вах на цифрових зображеннях клітин Saos-2 була проведена з використанням індексу просторової автокореляції Морана за допомогою програмних пакетів ImageJ v.1.53k (NIH, Bethesda, Maryland, USA) та Autocorrelation v.1.0 (НІР).

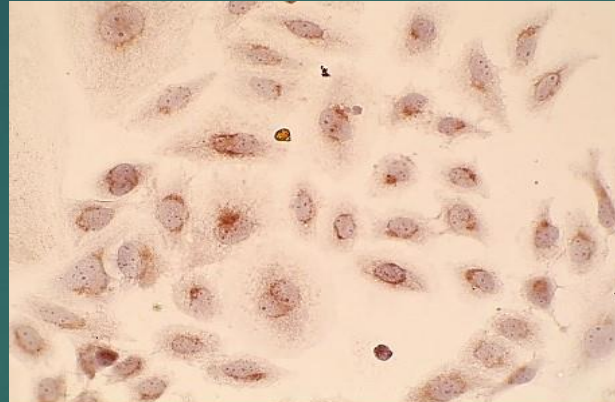
▶ Статистичний аналіз

Проведено за допомогою Statistica 6.0 (Statsoft, США) та IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM Inc., США). Тест Колмогорова-Смирнова використовувався, щоб оцінити, чи нормально розподілені дані. Відмінності між групами аналізували за t-критерієм Стьюдента та тестом Краскела-Уолліса. Статистична значущість була прийнята при $p < 0,05$.

Вплив на експресію Вах



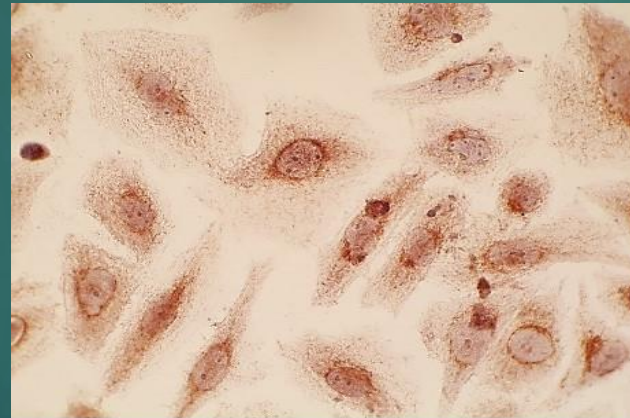
a



b

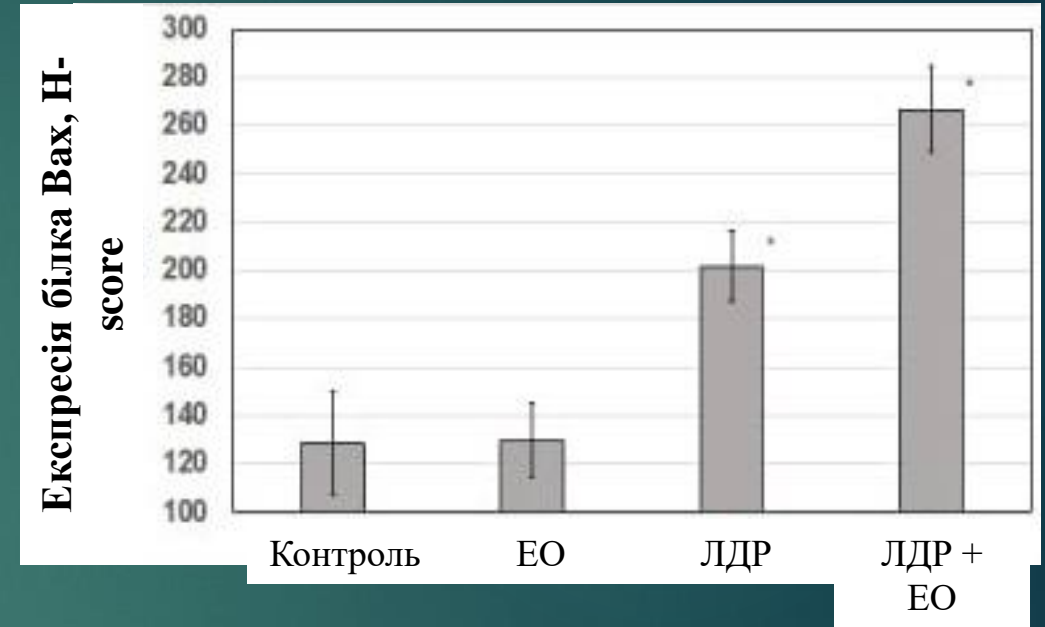


c



d

ВАХ експресія в Saos-2 клітинах: а – контроль, б – ЕО, с – ЛДР, d – ЛДР+ЕО.



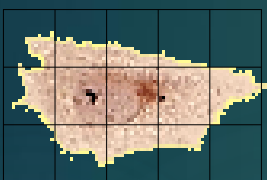
ВАХ експресія в Saos-2 клітинах

* Статистично значуща різниця від контролю, $p < 0,05$

Самостійний вплив ЛДР або в комбінації з ЕО викликали збільшення експресії Вах відповідно на 57% і 107% порівняно з клітинами Saos-2 у контрольній групі.

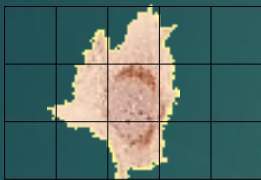
Вплив на гетерогенність експресії Вах

Типові приклади комп'ютерного аналізу сегментованих клітин Saos-2



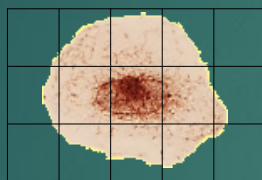
Контроль

Індекс Морана експресії Вах = **0.51**



ЕО

Індекс Морана експресії Вах = **0.55**



ЛДР

Індекс Морана експресії Вах = **0.71**



ЛДР + ЕО

Індекс Морана експресії Вах = **0.77**

НайВИЩА
гетерогенність просторового розподілу Вах

НайНИЖЧА
гетерогенність просторового розподілу Вах

Аналіз гетерогенності експресії Вах у клітинах Saos-2

Група	Індекс Морана, у.о.
Контроль	0.40 ± 0.004
ЕО	$0.45 \pm 0.004^*$
ЛДР	$0.53 \pm 0.008^{* \#}$
ЛДР + ЕО	$0.58 \pm 0.005^{* \# \&}$

* Статистично значуща різниця від контролю, $p < 0.05$;

Статистично значуща різниця від ЕО, $p < 0.05$;

& Статистично значуща різниця від ЛДР, $p < 0.05$.

Комбінація ЛДР + ЕО показала найнижчий ступінь просторової неоднорідності розподілу Вах, у порівнянні з дією ЛДР, самостійною впливом ЕО та клітинами без впливу.

Висновок

- ▶ 1. Самостійний вплив ліпосомального доксорубіцину або в комбінації з індуктивною помірною гіпертермією ініціює збільшення проапоптозного білка Вах у клітинах остеосаркоми Saos-2 відповідно на 57% і 107% ($p < 0,05$), порівняно з необробленими клітинами Saos-2.
- ▶ 2. Комп'ютерний аналіз цифрових зображень проапоптозного білка Вах у клітинах остеосаркоми Saos-2 з використанням індексу просторової автокореляції Морана засвідчив, що вплив ліпосомального доксорубіцину сумісно з індуктивною помірною гіпертермією супроводжувався найнижчим ступенем просторової неоднорідності в порівнянні з самостійним впливом кожного з двох діючих факторів ($p < 0,05$).

Дякую за увагу!